

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

(11) Numéro de publication:

0 162 757**A1**

(12)

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

(21) Numéro de dépôt: 85400805.9

(22) Date de dépôt: 24.04.85

(51) Int. Cl.⁴: **A 61 K 39/295****A 61 K 39/285, A 61 K 39/2-05****C 12 N 15/00, A 61 K 39/42**

(30) Priorité: 25.04.84 FR 8406499

(43) Date de publication de la demande:
27.11.85 Bulletin 85/48(64) Etats contractants désignés:
AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE(71) Demandeur: **TRANSGENE S.A.**
95 rue Saint-Lazare
F-75009 Paris(FR)(72) Inventeur: **Lathe, Richard**
Arc Abro Kings Buildings
West Mains Road Edinburgh EH9(FR)(72) Inventeur: **Kieny, Marie-Paule**
11, rue de Gascoigne
F-67000 Strasbourg(FR)(72) Inventeur: **Drillien, Robert**
10, Boulevard Paul Déroulède
F-67000 Strasbourg(FR)(72) Inventeur: **Lecocq, Jean-Pierre**
6, rue du Champ du Feu
F-67116 Reichstett(FR)(74) Mandataire: **Warcoïn, Jacques et al.**
Cabinet Régimbeau 26, avenue Kléber
F-75116 Paris(FR)

(64) Vaccin contre la rage et procédé pour sa préparation.

(67) La présente invention concerne un virus de la vaccine, caractérisé en ce qu'il comporte tout ou partie d'une séquence ADN(l) codant pour une glycoprotéine antigénique de la rage.

EP 0 162 757 A1

VACCIN CONTRE LA RAGE ET PROCEDE POUR SA PREPARATION

La rage est une maladie très ancienne mais, jusqu'à maintenant, son contrôle complet n'a pas pu être réalisé. Bien qu'il existe des vaccins efficaces contre la rage, de tels vaccins sont trop onéreux pour pouvoir être utilisés à titre préventif. En outre, il existe un réservoir très important de virus de la rage dans les animaux sauvages et pour cette raison, seuls des pays insulaires comme la Grande-Bretagne et le Japon, ont pu parvenir à une éradication de ce fléau.

L'agent causal de cette maladie est un Rhabdovirus. La transmission de la rage comporte en général la morsure d'un individu récepteur par un animal infecté ; le changement de comportement associé à l'infection chronique joue un rôle important dans l'étiologie de la maladie.

Dans l'homme, l'infection est suivie par une période de dormance pendant laquelle le virus voyage par le système nerveux jusqu'au cerveau. Au début, cette maladie peut être traitée de façon efficace par une vaccination intensive ; toutefois, lorsque les symptômes comportementaux apparaissent, la mort est presque inévitable.

Le virus comporte 5 protéines virales dont une seule, la glycoprotéine (G, haemmagglutinine), traverse la bicouche lipidique enveloppant le virus. Ainsi, la glycoprotéine est le seul composant viral capable de réagir avec des anticorps neutralisant le virus et également d'induire leur production.

Anilionis et al. (1981) ont décrit l'isolement d'une séquence codante correspondant à l'ARN messager de la glycoprotéine de la rage, souche ERA et Lathe et al. (1984) ont décrit l'expression de cette séquence dans une bactérie.

Des résultats similaires ont été rapportés par Yelverton et al. (1983) en utilisant une deuxième souche de rage, CVS.

Toutefois, une immunisation efficace contre le virus de la rage utilisant la matière synthétisée par les bactéries n'a pas encore pu être réalisée.

Des résultats préliminaires suggèrent que des modifications post-traductionnelles et/ou une présentation de la glycoprotéine sont des paramètres importants dans l'utilisation de cet antigène pour qu'il confère une protection contre le virus de la rage.

La présente invention décrit l'expression d'une séquence codant pour la glycoprotéine de la rage dans un environnement tel qu'une modification et une présentation correctes des produits de traduction primaire puissent intervenir.

Deux groupes ont récemment mis en évidence l'utilisation de recombinants vivants du virus de la vaccine pour exprimer l'antigène de l'Influenza ou de l'Hépatite B pour immuniser contre ces maladies (Smith et al., 1983 ; Panicali et al., 1983).

L'expression d'une séquence codante pour une protéine exogène dans le virus de la vaccine (VV) implique nécessairement deux étapes :

1°) La séquence codante doit être alignée avec un promoteur de VV et être insérée dans un segment non essentiel de l'ADN de VV cloné dans un plasmide bactérien approprié ;

2°) Les séquences d'ADN de VV situées de part et d'autre doivent permettre des recombinaisons homologues in vivo entre le plasmide et le génome viral. Une double recombinaison réciproque conduit à un transfert de l'insert d'ADN du plasmide dans le génome viral dans lequel il est propagé et exprimé (Panicali et Paoletti, 1982 ; Mackett et al., 1982 ; Smith et al., 1983 ; Panicali et al., 1983).

La présente invention concerne un virus de la vaccine caractérisé en ce qu'il comporte tout ou partie d'une séquence d'ADN codant pour une glycoprotéine antigénique de la rage, nommée ci-après séquence d'ADN(I).

Par "virus de la vaccine", on entend désigner tout ou partie d'un virus du genre Poxvirus, en particulier du sous genre vaccine, qui incorpore, outre la vaccine elle-même, d'autres virus tels que le "Cowpox".

On entend désigner par "glycoprotéine antigénique de la rage" une glycoprotéine qui, in vitro, mais de préférence in vivo, présente des caractéristiques immunogéniques identiques ou voisines de la glycoprotéine de la rage vraie, c'est-à-dire celle du virus sauvage.

Bien que l'on préfère utiliser pour la séquence ADN(I) la séquence d'ADN codant pour la protéine mature complète, il est possible d'utiliser seulement une partie de cette séquence d'ADN ou une telle séquence portant des mutations ponctuelles mais qui conduisent à des produits ayant des activités quasi identiques.

Ce virus comportera de préférence l'ensemble des éléments assurant l'expression de ladite glycoprotéine, en particulier un promoteur d'un gène de la vaccine tel que le promoteur du gène de 7,5K noté P7,5K qui sera placé en amont de la séquence d'ADN(I).

Cet ensemble promoteur/séquence d'ADN(I) sera inséré dans un gène du virus de la vaccine, par exemple le gène TK, ce qui fournit une possibilité de sélection comme cela sera expliqué ci-après.

Le virus hybride ainsi obtenu peut être utilisé tel quel, vivant ou inactivé par traitement chimique ou physique, comme agent vaccinant ou bien être utilisé pour infecter une culture cellulaire de laquelle on pourra extraire la glycoprotéine antigénique par des techniques connues à partir du broyat cellulaire.

On peut encore envisager, pour réduire au maximum les risques d'accidents de vaccination avec un virus vivant, d'utiliser un mutant thermosensible de la vaccine (F. Keller et col., 1978 et F. Keller et R. Drillien, 1980. En outre, ce type de mutation ts peut exister sur le

Ce type de mutation ts peut exister sur le vecteur vaccine lui-même ou bien être introduit par mutation dans les virus recombinants selon l'invention. En particulier, on peut introduire dans le virus recombinant différentes thermosensibilités afin de maintenir le phénotype, même en cas de réversion partielle.

En outre, on peut prévoir l'utilisation d'un virus mutant de la vaccine présentant une spécificité d'hôte qui ne pousse pas ou peu sur des cellules humaines et dont la pathogénicité est encore plus faible que celle de la vaccine.

La présente invention concerne, en outre, des vaccins destinés au traitement ou à la prévention de la rage, caractérisés en ce qu'ils comportent un virus hybride selon l'invention ou une glycoprotéine obtenus par la mise en oeuvre du procédé précédent.

L'invention concerne également les anti-sérums obtenus à partir d'animaux immunisés par les vaccins selon l'invention.

Pour ces vaccins, les voies d'administration peuvent être variées, en particulier on peut procéder par voie intradermique ou orale. Ces vaccins peuvent être administrés avec des supports pharmaceutiques connus et comporter, en outre, des adjuvants permettant d'augmenter leur pouvoir vaccinant.

Les exemples ci-après sont destinés à mettre en évidence d'autres caractéristiques et avantages de la présente invention.

La préparation du virus selon l'invention comporte notamment les étapes suivantes :

1) une restructuration d'une extrémité du CADN de la rage, schématisée à la figure 1, par le procédé schématisé à la figure 2, pour obtenir pTG155 ;

2) une mutation d'une des séquences de ce CADN afin de rétablir dans la glycoprotéine la proline au 8ème acide aminé, figure 3, pour obtenir ptg155-pro ;

3) La synthèse d'un mini-plasmide ptg1H à partir de pBR322 (figure 4) ;

4) l'insertion dans ce mini-plasmide du fragment Hin-J portant le gène TK de VV ;

5) l'insertion dans le gène TK du promoteur de la protéine 7,5K (figure 5) ;

6) l'insertion sous le promoteur de P7,5K du gène de la rage porté par ptg155-pro (figure 5) ;

7) le clonage des éléments essentiels de ce dernier plasmide dans le virus de la vaccine (figure 6).

Les exemples suivants illustrent les propriétés des différents composants obtenus.

5 Les différents matériels mis en oeuvre sont identifiés dans les exemples.

Sauf indication contraire, les enzymes sont utilisées dans les conditions préconisées par le fabricant et les techniques mises en oeuvre sont connues de l'homme de métier.

10 Les séquences d'acides aminés et les séquences de nucléotides représentées sur les figures ne sont pas reprises dans le corps de la description pour ne pas l'alourdir mais elles en constituent une partie intégrante.

15 Restructuration du cADN de la glycoprotéine de la rage

La séquence codant pour la glycoprotéine de la rage publiée par Anilionis et al. et représentée à la figure 1, comporte des éléments qui peuvent gêner sa traduction et son expression comme antigène.

20 le cADN de la glycoprotéine de la rage qui provient du plasmide PRG décrit par Anilionis et col. (1981) et est porté, sur un fragment BglIII/BglIII, par différents plasmides comme pTG147, pTG171, pTG150, a déjà
25 été décrit dans le brevet français n° 83 15716.

Tout d'abord, l'ATG correspondant au codon d'initiation pour le message mature se trouve immédiatement adjacent à une séquence polyG introduite par la procédure de clonage du cADN. Cette séquence est susceptible
30 de provoquer une instabilité lors de la recombinaison in vivo entre les éléments G/C à chacune des extrémités du cADN et peut de plus gêner la traduction du message.

Ensuite, les séquences du cADN de la glyco-protéine ne correspondent pas parfaitement à la séquence codant pour la partie N-terminale de la glycoprotéine mature. C'est pourquoi il a été décidé d'éliminer ces deux obstacles avant d'effectuer le clonage de la séquence codante correspondant.

Kozak (1981, 1983) a montré que les codons d'initiation de la traduction dans les eucaryotes se trouvent normalement dans une séquence qui peut être représentée de la façon suivante : A ~~X~~ ~~X~~ ATG (A ou G) et des altérations de cette séquence peuvent conduire à des diminutions de la traduction. Bien que l'importance de ces nucléotides d'extrémité ne soit pas parfaitement établie, il semble préférable d'éliminer la séquence G/C adjacente et de conserver l'essence de la séquence consensus mentionnée précédemment. En outre, il est nécessaire de prévoir une séquence de reconnaissance BglII en amont de façon à faciliter la manipulation subséquente.

En restructurant l'extrémité 5' du cADN, comme cela est représenté à la figure 2, on a profité de l'existence d'un site unique MstII qui recouvre les codons codant pour les amino-acides 2, 3 et 4 du produit de traduction primaire.

Dans le plasmide pTG150, le cADN de la glyco-protéine de la rage d'Anilionis a été inséré, en utilisant des oligo-nucléotides adaptateurs PstI/BglII (Lathe et al. 1982) dans un site unique BglII inséré dans le site HindIII du plasmide pBR327. (Soberon et col., 1980).

Ce plasmide, représenté en A de la figure 2, a été mis en digestion partielle avec BglII et en digestion complète avec MstII et les fragments linéaires appropriés

ont été isolés par électrophorèse sur un gel d'agarose à basse température de gélification. Les oligonucléotides (5'-dGATCTAATATGGTTCC-3') et (5'-dTGAGGAACCATATTA-3') ont été synthétisés selon une technique précédemment décrite (Kohli et al., 1982). Les oligonucléotides sont hybridés pour donner un duplex partiel (B de la figure 2) et insérés entre les extrémités BglII et MstII du plasmide linéaire purifié, ce qui permet la recircularisation et génère le plasmide pTG155 (C de la figure 2).

Le 8ème amino-acide de la glycoprotéine mature (ne présentant pas la séquence signal) des souches de virus ERA et CVS de la rage est la proline, tandis que dans le cADN isolé par Anilionis et al., on trouve, à cette position, un triplet codant pour la leucine.

Dans pTG155 représenté à la figure 3, le site mutant est flanqué par un site en amont EcoRI dans le vecteur et par un site HindIII sur les séquences correspondant aux amino-acides 10 et 11 de la séquence codant pour la glycoprotéine mature. Ce petit fragment EcoRI/HindIII est cloné dans le bactériophage M13tg131 (Kieny et al., 1983) en orientation inverse. Une mutagenèse localisée dirigée par un oligonucléotide est effectuée selon la technique de Zoller et Smith (1983) en utilisant l'oligonucléotide (5'-dATCACGATCCCAGACAAGC-3') synthétisé comme cela a été indiqué précédemment.

Le codon pour l'acide-amino 8 dans la séquence de cADN est changé pour remplacer CTA en CCA.

L'oligonucléotide (19-mer) contient deux modifications par rapport à la séquence originale : un T en place de C, ce qui corrige le triplet de la

leucine CTA en proline CCA, et un A en place de C qui correspond à une transversion dans la séquence GATA. Ceci génère une séquence GATC de dam méthylation ce qui favorise l'incorporation de la séquence d'oligonucléotide par correction des faux appariements sélectifs in vivo.

Il faut remarquer que le fragment EcoRI/HindIII qui a été cloné en orientation inverse de celle qui est présentée ici de façon que le brin inférieur, complémentaire de l'oligonucléotide, soit présent dans le bactériophage recombinant M13 mono-brin.

Des plages de phages sont examinées pour l'hybridation dans des conditions appropriées avec l'oligonucléotide marqué à son extrémité 5' par ³²P. Un certain nombre de plages positives sont prélevées et les inserts correspondants sont séquencés. L'insert de l'un des clones correctement modifié est recloné dans pTG155 en échangeant les fragments EcoRI/HindIII pour générer finalement le plasmide restructuré pTG155-pro. L'analyse des clones apparaissant pendant cette étape est facilitée par l'existence d'un nouveau site pour l'enzyme de restriction Sau3A qui coïncide avec la séquence de méthylation dam introduite pendant la mutagenèse dirigée par oligonucléotide

Dans le plasmide pTG155-pro, le cADN de la glycoprotéine de la rage restructuré est flanqué à chacune de ses extrémités par des sites BglIII. A l'extrémité aval le site BglIII provient de l'utilisation de l'oligonucléotide adaptateur BglIII/PstI octamer utilisé pour cloner le fragment de cADN PstI/PstI dans le site BglIII et le site en amont résulte de l'utilisation d'un petit oligonucléotide double brin destiné à éliminer l'extrémité C/C.

Construction des plasmides hybrides

Les tailles combinées des différents éléments nécessaires pour le transfert de la séquence codant pour la glycoprotéine de la rage dans le génome de VV et son expression subséquente sont de l'ordre de plusieurs kb. Il a donc été jugé nécessaire de minimiser la taille du plasmide de réplication dans *E. coli* utilisé pour le travail de construction de façon à faciliter les manipulations nécessaires.

Le fragment HindIII (Hin-J) du génome de VV contient le gène complet de la thymidine kinase (TK) qui a déjà été utilisé précédemment pour permettre l'échange et la recombinaison de l'ADN inséré dans le génome de VV (Mackett et al., 1982). Il est important de noter que le transfert d'un insert dans le gène TK dans le génome de VV crée un virus TK déficient qui peut être reconnu par simple sélection. Il a tout d'abord été nécessaire de produire un plasmide de petite taille portant un site unique HindIII utilisable pour l'intégration du fragment Hin-J VV. En outre, il était nécessaire d'éliminer les séquences de restriction non nécessaire du plasmide de façon à permettre les manipulations suivantes.

La construction a été amorcée à partir du plasmide pML2 (Lusky et Botchan, 1981) qui est un vecteur dérivé du plasmide pBR322 par délétion spontanée dans lequel le segment entre le nucléotide 1089 et 2491 a été perdu (figure 4). D'abord la séquence de PstI a été éliminée par insertion du fragment AhaIII-AhaIII de pUC8 (Vieira et Messing, 1982) entre deux sites

AhaIII de pML2 en éliminant 19 paires de bases. On a utilisé la méthode de "linker-tailing" (Lathe et al., 1984) pour insérer un linker HindIII entre les sites NruI et EcoRI traité par S1 de ce plasmide, en éliminant le site BamHI. Ceci conduit à un plasmide de 2049 paires de bases portant le gène β -lactamase fonctionnel (conférant la résistante à l'ampicilline et comportant en outre une origine de répllication active dans E. coli et un site de restriction unique HindIII.

Cette construction a été appelée pTG1H.

Le fragment Hin-J de l'ADN de VV portant le gène TK a préalablement été cloné dans un vecteur provenant de pBR327 (Drillien et Spehner, 1983). Ce fragment de 4,6 kb a été recloné dans le site HindIII de pTG1H. Un clone a été sélectionné dans lequel le gène TK est situé distalement par rapport au gène codant pour la résistance à l'ampicilline.

Cette construction pTG1H-TK a été utilisée comme porteur dans l'expérience suivante.

L'étape suivante a été d'isoler un promoteur de VV utilisable pour commander l'expression de la séquence codant pour la glycoprotéine de la rage insérée. Le promoteur d'un gène précoce codant pour une protéine de 7 500 daltons (7,5K) a déjà été utilisé avec succès dans un but identique (Smith et al., 1983) et on a donc procédé à l'isolement de ce segment.

Le gène 7,5K est situé sur l'un des plus petits fragments SalI (fragment Sal-S) du génome de VV type WR (Venkatasen et al., 1981). Comme les petits fragments sont

clonés de façon préférentielle, une grande proportion des clones obtenus par clonage direct de l'ADN de VV type WR coupé par SalI dans le plasmide pBR322 porte le fragment Sal-S. Ce fragment est transféré sur le bactériophage vecteur M13mp701 (voir Kieny et al., 1983), par digestion SalI et religation, en conduisant ainsi au phage M13tgSal-S.

Dans ce clone, un site ScaI se trouve immédiatement à proximité de l'ATG d'initiation du gène 7,5K. En aval du gène 7,5K se trouvent situés des sites uniques BamHI et EcoRI provenant du vecteur. Les sites BamHI et ScaI sont fusionnés par l'intermédiaire d'un linker BglII 5'-CAGATCTG-3' par la technique des "linker" après avoir complété les extrémités générées par digestion BamHI avec le fragment Klenow de la polymérase. Ce procédé élimine le site ScaI mais reconstitue le site BamHI et déplace le site unique EcoRI en aval. En même temps, le site SalI(AccI) en aval est éliminé, le site en amont devient donc unique.

Cette construction est appelée M13tg7,5K.

A l'intérieur du fragment Hind-J de l'ADN de VV se trouvent situés des sites ClaI et EcoRI qui sont séparés par environ 30 paires de bases (Weir et Moss, 1983). Le fragment promoteur de 7,5K présent dans M13tg7,5K est excisé par AccI et EcoRI et cloné entre les sites ClaI et EcoRI de pTG1H-TK pour générer pTG1H-TK-P7,5K dont la synthèse est schématisée figure 5.

Cette construction conduit au transfert du site BamHI unique du vecteur M13 immédiatement en aval de la séquence du promoteur 7,5K. Ce site unique BamHI est utilisé dans les constructions suivantes.

pTG1H-TK-P7,5K est mis en digestion avec BamHI et ligué avec pTG155-pro digéré par BglII. (figure 5).

Après transformation de E. coli, l'un des plasmides recombinants isolé par cette procédure, pVVgRAB, est sélectionné car il porte le cADN de la glycoprotéine de la rage dans l'orientation correcte pour l'expression à partir du promoteur de 7,5K.

pVVgRAB sera parfois noté pTG1H-TK-P7,5K-gRAB.

Clonage dans le virus de la vaccine (figure 6)

La stratégie décrite par Smith et al. (1983) repose sur l'échange in vivo entre un plasmide portant un insert dans le gène VV TK et le génome viral de type sauvage de façon à inactiver le gène TK porté par le virus. Les virus TK⁻ peuvent être sélectionnés par étalement sur une lignée cellulaire TK-négative en présence de 5-bromo-déoxyuridine (5BUDR) (Mackett et al., 1982). La thymidine kinase phosphoryle le 5BUDR en 5'-monophosphate, qui est ensuite converti en triphosphate. Ce composé est un analogue de dTTP et son incorporation dans l'ADN bloque le développement correct du virus. Un virus TK⁻ peut néanmoins répliquer son ADN normalement et il conduit à des plaques virales visibles dans une couche cellulaire également TK⁻.

Le virus de la vaccine se propage dans le cytoplasme des cellules infectées plutôt que dans leur noyau. C'est pourquoi il n'est pas possible de tirer avantage de la machinerie de répllication et de transcription de l'ADN de l'hôte et il est nécessaire que le virion possède les composants pour l'expression du gène viral. L'ADN de VV purifié est non-infectieux.

Afin de générer les recombinants, il est nécessaire d'effectuer simultanément l'infection cellulaire

avec un VV et une transfection avec le segment d'ADN cloné qui présente de l'intérêt. Toutefois, la génération des recombinants est limitée à une petite proportion des cellules compétentes pour la transfection à l'ADN.

5 C'est pour cette raison qu'il a été nécessaire de mettre en oeuvre une stratégie de "congruence" indirecte pour réduire le bruit de fond des virus parentaux non-recombinants. Ceci a été effectué en utilisant comme virus infectieux vivant un mutant thermosensible (ts) de la vaccine qui

10 n'est pas capable de se propager à une température non permissive de 39,5°C (Drillien et Spehner, 1983). Lorsque les cellules sont infectées avec un mutant ts dans des conditions non permissives et transfectées avec l'ADN d'un virus de type sauvage, la multiplication virale inter-

15 viendra seulement dans les cellules qui sont compétentes pour la transfection et dans lesquelles une recombinaison entre l'ADN viral sauvage et le génome du virus ts aura eu lieu ; aucun résultat ne sera obtenu dans les autres cellules, en dépit du fait qu'elles ont été infectées.

20 Si un plasmide recombinant contenant un fragment de l'ADN de vaccine tel que pVVgRAB est inclus dans le mélange de transfection à la concentration appropriée avec l'ADN du type sauvage, il est également possible d'obtenir qu'il participe à la recombinaison homologe avec l'ADN de la

25 vaccine dans les cellules compétentes.

Des monocouches de cellules primaires de fibroblastes d'embryons de poulets (CEF) sont infectées à 33°C avec VV-copenhague ts 26 (0,1 pfu/cellule) et transfectées avec un coprécipité au phosphate de calcium de l'ADN de

30 type sauvage VV-Copenhague (0,5 µg/10⁶ cellules) et de plasmide recombinant pTG1H-TK-P7,5-gRAB (3,0 µg/10⁶ cellules). Il faut remarquer que les concentrations plus faibles (0,1 µg/10⁶ cellules) ont dans les expériences suivantes donné des rendements sensiblement améliorés en recombinants.

Après incubation pendant 2 heures à une température qui ne permet pas le développement du virus ts (39,5°C), les cellules sont rincées et incubées pendant 48 heures à 39,5°C. Des dilutions de virus ts⁺ sont utilisées pour réinfecter une monocouche de cellules de souris L-TK⁻ à 37°C et incubées en présence de 5BUdR (100 µg/ml). Différentes plaques TK⁻ sont obtenues à partir de ces cellules qui ont reçu le plasmide recombinant tandis que les cultures de contrôle sans plasmide ne montrent pas de plaques visibles.

Une double recombinaison réciproque correcte entre le plasmide hybride rage/vaccine et le génome de VV échange le gène viral TK pour le gène TK porté par l'insert présent dans le plasmide. Dans le génome de VV le gène TK est présent sur un fragment unique HindIII:Hin-J. Les recombinants ayant transféré le bloc d'expression de la glycoprotéine de la rage sont sensés avoir intégré un site interne HindIII dérivant du cADN de la glycoprotéine. C'est pourquoi les ADN purifiés à partir de virus TK⁻ sont digérés avec HindIII et soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose. Comme cela était prévisible, le fragment Hin-J de 4,6 kb est absent, par contre deux nouveaux fragments de 1,1 et 5,5 kb révèlent la présence d'un insert contenant un site interne HindIII. Après sous clonage des virus TK⁻ l'un des recombinants VVgRAB-26D3 est conservé.

Expression de la glycoprotéine de la rage à partir des virus de vaccine recombinants

Des mono-couches de cellules L-TK⁻ semi-confluentes sont infectées avec VVgRAB-26D3 (50 pfu/cellule) pendant 1 heure à la température ambiante puis un milieu de culture exempt de méthionine est ajouté, et après 30 mn chaque boîte de culture est complétée avec de

la L-méthionine 35_{S1} (1265 Ci/m mole) et l'incubation est poursuivie à 37°C pendant 4 heures. Les cellules sont récoltées, resuspendues dans un tampon d'immunoprécipitation contenant des inhibiteurs de protéase et après éclatement aux
5 ultra-sons et clarification, les protéines fixées par l'anti-sérum anti-rage sont récupérées par chromatographie d'affinité sur une résine protéine A - sépharose et chargées sur un gel d'électrophorèse et fluorographiées par une technique décrite par Lathe et al., (1980).

10 Un anti-sérum polyclonal 3554-R215 dressé contre la glycoprotéine purifiée au Wistar Institute a été utilisé dans les expériences illustrées dans la figure 7, A (a) et B ; des résultats identiques sont obtenus (b,c) avec deux anticorps monoclonaux neutralisant les virus (509-6 et
15 101-1 du Wistar) qui identifient différents épitopes sur la glycoprotéine de la rage. En A la monocouche cellulaire est infectée avec :

- 1) le recombinant VVgRAB-26D3,
- 2) le virus de la vaccine du type sauvage,
- 20 3) aucun virus.

En (B) une mono-couche cellulaire est infectée avec VVgRAB-26D3 et marquée en présence (1) ou absence (2) du tunicamycine (2µg/ml).

25 Dans (A) et (B) les poids moléculaires standards sont donnés en kilodaltons.

Comme cela apparaît dans la figure 7A, un anti-sérum rabique polyclonal de même que deux anticorps monoclonaux neutralisent le virus, précipitent une protéine qui migre sous forme d'une bande diffuse avec un poids
30 moléculaire apparent d'environ 66 000 daltons. Ce poids moléculaire correspond précisément au poids, 67 000 daltons, d'une glycoprotéine rabique authentique.

Comme le poids moléculaire de la glycoprotéine naturelle et du recombinant correspondent, on a

vérifié que la glycoprotéine recombinante était glycosylée in vivo. Une mono-couche cellulaire a été infectée avec VVgRAB-2603 comme précédemment, et on a ajouté au milieu avant le marquage un inhibiteur puissant de la glycosylation, la tunicamycine (2µg/ml). Les extraits de cellules infectées sont immunoprécipités en utilisant un anticorps polyclonal et le produit est chargé sur un gel d'électrophorèse comme précédemment. Comme le montre la figure 7B, l'addition de tunicamycine au milieu conduit à une réduction du poids moléculaire de la glycoprotéine recombinante de 66 000 daltons, ceci correspond à l'élimination des groupements glycosylés de la protéine. On peut donc en conclure que la glycoprotéine rabique recombinante est glycosylée dans les cellules infectées par VVgRAB. Différentes bandes additionnelles dans la ligne (1) sont présumées être des produits de dégradation de l'antigène de la rage non glycosylé.

Dans une autre expérience, une mono-couche de cellules L-TK⁻ est infectée avec VVgRAB-26D3 (10⁵ pfu par plaque contenant 10⁶ cellules) et incubée pendant 8 heures à 37°C. Les cellules sont fixées, traitées avec des anticorps monoclonaux et polyclonaux et après un lavage très complet, l'anticorps fixé est détecté en utilisant un deuxième anticorps (chèvre anti-souris) marqué par fluoresceine. La plupart des cellules infectées par le recombinant VVgRAB-26D3 (A) montrent une fluorescence significative tandis que les cellules non infectées (C) et les cellules infectées avec les virus non-recombinants (B) ne montrent pas de fluorescence.

Comme cela ressort de la figure 8, la fluorescence est associée en priorité avec la membrane cytoplasmique comme cela pouvait être attendu d'une protéine transmembranaire.

5 Propriétés immunologiques in vivo du virus
 hybride vaccine/rage vivant

Des lapins sont immunisés par intra-dermo avec 3×10^7 pfu de VVGRAB-26D3 et des échantillons de sérum sont prélevés au bout de 0, 11 et 14 jours. Une enflure reconnaissable est observée au site d'infection qui diminue après 8 à 9 jours. Une souche de virus rabique ERA inactivée avec de la β -propiolactone et marquée avec I^{125} selon le protocole standard et testée pour sa réaction avec le sérum des animaux immunisés.

15 Les protéines fixées sont placées sur gel d'électrophorèse et autoradiographiées.

Les sérums de 11 et 14 jours, mais pas le sérum du jour de contrôle 0, se sont trouvés reconnaître et fixer efficacement la glycoprotéine virale radiomarkée.

20 Le sérum des animaux de contrôle immunisés avec le virus de la vaccine non-recombinant de type Copenhague ne donne pas de telles réactions. Le sérum des animaux immunisés décrit précédemment, est ensuite testé pour l'inactivation du virus rabique in vitro. Les dilutions de la souche ERA

25 rabique sont préincubées pendant 1 heure avec différentes quantités de l'anti-sérum de lapin et étalés sur des cellules de reins de hamsters nouveau-nés (BHK) sur des plaques à microtitration (10^3 cellules/puits). Après incubation à 37°C pendant 22 heures, les cellules infectées productrices sont colorées en utilisant une technique d'immuno-

30 fluorescence directe.

Le tableau I indique que même pour les dilutions les plus élevées de l'anti-sérum de 11 et 14 jours une inactivation complète du virus est obtenue. Les sérums préimmuns et non recombinants ne donnent pas de neutralisation détectable. Les titres sont donnés comme la plus forte dilution à laquelle on observe l'inhibition de l'infection.

TABLEAU I

Nbre de jours après la vaccination	VVgRAB26D3				Vaccine Type Sauvage
	Lapin I	Lapin II	Lapin III	Lapin IV	
0	0	0	0	0	0
11	10000	10000	10000	10000	0
14	>30000	>30000	>30000	>30000	0

Ces résultats démontrent que le recombinant VVgRAB-26D3 n'induit pas seulement la production d'anticorps réagissant avec le virus rabique, mais également que l'anti-sérum d'animaux immunisés est capable d'inactiver le virus rabique in vitro. L'induction d'anticorps neutralisant n'est pas toujours en corrélation avec une protection contre le développement de la maladie. C'est pourquoi il a été effectué une étude directe d'un test de protection en utilisant le virus recombinant. Des souris sont immunisées par injection dans la patte ou grattage sur la queue avec 10^7 pfu de VVgRAB-26D3 vivant. Ces animaux sont ensuite inoculés avec une dose létale (1000 unités, DL50) d'un virus rabique sauvage introduit par injection intra-cérébrale. Après 10 jours, le groupe

des animaux de contrôle immunisés avec la vaccine non recombinante présente une infection rabique terminale, au contraire, 15 des 15 animaux immunisés avec VVgRAB-26D3 ne montrent aucune trace de maladie.

- 5 On peut donc conclure que l'immunisation avec le virus recombinant vaccine/rage vivant conduit à une protection contre la rage.

Propriétés immunologiques in vivo du virus
hybride vaccine/rage inactivé

- 10 Trois types de vaccin inactivé peuvent être préparés à partir des cellules infectées par le virus recombinant vaccine/rage : soit un extrait brut de cellules infectées, soit du virus intact purifié, soit la glycoprotéine G purifiée. Les trois préparations sont inactivées au
- 15 β -propiolactone.

- Des cellules BHK infectées par VVgRAB-26D3 sont homogénéisées au broyeur de Dounce, et le surnageant de centrifugation représente l'extrait brut de cellules.
- Pour obtenir le virus purifié tué, cette préparation
- 20 est inactivée au β -propiolactone 1/4000 et centrifugée sur un gradient de sucrose selon des techniques classiques.
- la glycoprotéine G purifiée est obtenue par solubilisation de l'extrait brut en présence de Triton X-100 2 %.
- 25 Après centrifugation 1 heure à 100 000 g, G est isolée à partir du surnageant grâce à un passage sur une colonne d'affinité préparée avec un anticorps monoclonal anti-G. Cette glycoprotéine G purifiée est également inactivée au β -propiolactone.

- 30 Des souris sont immunisées par 2 injections intrapéritonéales de 0,5 ml de ces préparations inactivées à 1 semaine d'intervalle, et soumises à l'épreuve 1 semaine plus tard (240 unités DL50) par voie intracérébrale

Le tableau II indique les anticorps anti-rabiques mesurés aux jours 7 et 14.

TABLEAU II

	Quantité de protéines injectées en µg/souris	Titre des anticorps anti-rabiques	
		Jour 7	Jour 14
VVgRAB-26D3 extrait brut	140	80	8 000
VVgRAB-26D3 virus purifié	9	270	4 000
VVgRAB-26D3 G purifiée	50	120	15 000
Vaccine type Copenhagen extrait brut	900	10	10

Tous les animaux vaccinés avec les différentes préparations de vaccin inactivé dérivé de VVgRAB-26D3 survivent à l'injection intracérébrale de virus rabique, alors que les animaux du groupe contrôle meurent dans les délais attendus.

Il est important de noter que, même inactivé, le virus hybride VVgRAB-26D3 confère une protection efficace contre l'infection rabique expérimentale. Ceci démontre que dans le virus recombinant intact, la glycoprotéine de la rage est présentée à la surface du virion et est susceptible d'induire une réponse immunologique semblable à celle induite par le virus de la rage inactivé.

Vaccination des renards et vaccination
par voie orale

En Europe de l'Ouest, le renard est le principal agent de dissémination de la rage. Il est donc fondamental
5 de pouvoir maîtriser la vaccination du renard. De préférence, celle-ci se fera par voie orale afin de minimiser la manipulation des animaux.

Les renards roux (*Vulpes vulpes*), âgés de moins d'un an, sont immunisés par diverses voies avec 10^8 pfu
10 de VVgRAB-26D3 vivant. Les témoins sont composés de 2 renards vaccinés avec du vaccin anti-rabique classique tué, et de 4 renards vaccinés avec la vaccine type sauvage.

Le tableau III donne le titre d'anticorps anti-rabiques mesurés au jour 7, 14 et 28. Ce tableau montre que
15 chez le renard comme chez la souris, le virus recombinant vaccine-rage induit une production d'anticorps comparable à celle induite par le vaccin classique.

Les animaux vaccinés sont soumis à l'épreuve de
20 l'injection de virus rabique virulent, au jour 28.

Les renards vaccinés avec le virus type sauvage meurent dans les délais attendus. Tous les renards vaccinés avec le vaccin tué classique ou avec VVgRAB-26D3 (même le renard (2) inoculé par voie sous-cutanée et qui ne
25 présentait pas d'anti-corps séro-neutralisants) sont vivants 2 mois après l'épreuve.

Les renards vaccinés avec le virus type sauvage meurent dans les délais attendus. Tous les renards vaccinés avec le vaccin tué classique ou avec VVgRAB-26D3 (même le renard (2) inoculé par voie sous-cutanée et qui ne présentait pas d'anti-corps séro-neutralisants) sont vivants 2 mois après l'épreuve.

Vaccin utilisé	Voie d'inoculation	Titre d'anticorps *		
		jour 6	jour 14	jour 18
Classique tué	sous cutané (1)	0,33	0,64	0,24
	(2)	0,07	0,05	0,07
Vaccine type sauvage	intra-dermique	-	-	-
VVgRAB-26D3	intra-dermique (1)	0,64	6,1	4,4
	(2)	0,05	0,6	1,67
VVgRAB-26D3	sous-cutané (1)	0,46	2,32	4,3
	(2)	-	-	-
VVgRAB-26D3	orale avec scarification des muqueuses (1)	0,33	0,88	1,67
	(2)	0,24	0,88	2,31

* Les titres en anticorps sont exprimés en unités internationales (sérum de référence - 65 U.I. - neutralisant à $10^{-4.2}$)

La souche suivante a été déposée dans la Collection

Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) - 28, rue du Docteur Roux
75724 PARIS CEDEX 15 :

E. Coli TGE1106 transformée par pTG171

no. I-248

déposée le 30 septembre 1983

REFERENCES

- Anilionis, A., Wunner, W.H. & Curtis, p.J. (1981) *Nature* 294, 275-278.
- Drillien, R. & Spehner, D. (1983) *Virology* 131, 385-393.
- Kieny, M.P., Lathe, R. & Lecocq, J.P. (1983) *Gene* 26, 91-99.
- Kohli, V., Balland, A., Wintzerith, M., Sauerwald, R., Staub, A. & Lecocq, J.P. (1982) *Nucleic Acids Res.* 10, 7439-7448.
- Kozak, M. (1981) *Nucleic Acids Res.* 9, 5233-5252.
- Kozak, M. (1983) *Microbiol. Rev.* 47, 1-45.
- Lathe, R., Hirth, P., Dewilde, M., Harford, N. & Lecocq, J.P. (1980) *Nature* 284, 473-474.
- Lathe, R., Balland, A., Kohli, V. & Lecocq, J.P. (1982) *Gene* 20, 187-195.
- Lathe, R., Kieny, M.P., Schmitt, D., Curtis, P. & Lecocq, J.P. (1984a) *J. Mol. Appl. Genet.*, in press.
- Lathe, R., Kieny, M.P., Skory, S. & Lecocq, J.P. (1984a) *DNA*, in press.
- Lusky, M., Botchan, M. (1981) *Nature* 293, 79-81.
- Mackett, M., Smith, J.L. & Moss, B. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 7415-7419.
- Panicali, D. & Paoletti, E. (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 4927-4931. Panicali, D., Davis, S.W., Weinberg, R.L. & Paoletti, E. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 5364-5368.
- Smith, G.L., Mackett, M. & Moss, V. (1983) *Nature* 302, 490-495.
- Soberon et coll, *Gene* 9, 287-305 (1980).
- Venkatesan, S., Baroudy, B.M. & Moss, B. (1981) *Cell* 125, 805-813.

- Vieira, J. & Messing, J. (1982) Gene **19**, 259-268.
- Weir, J.P. & Moss, B. (1983) J. Virol. **46**, 530-537.
- Wiktor, T.J. (1978) Develop. Biol. Standard **40**, 255-264.
- Wiktor, T.J. (1980) in Rhabdoviruses III pp. 99-112
(ed. D.H.L. Bishop) CRC Press, Inc.
- Wunner, W.H., Dietzschold, B., Curtis, P.J. & Wiktor, T.J.
(1983) J. Gen. Virol. **64**, 1649-1659.
- Yelverton, E., Norton, S., Obijeski, J.F. & Doeddel, D.V.
(1983) Science **219**, 614-620.
- Zoller, M.J. & Smith, M. (1983) in Methods in Enzymology,
Vol. 100, pp. 468-500 (Eds. Wu, R., Grossman, L., Moldave,
K.) Academic Press, London.
- Keller F., Drillien R. et Kirn A.: Thermosensibilité du
développement des poxvirus et virulence. Utilisation de
souches thermosensibles comme vaccin. Rencontre Biologique,
1978 (L. Hartmann), p. 121-126, Ed. Varia, Paris.
- Keller F. et Drillien R. : Un mutant thermosensible atténué
du virus vaccinal. Ann. Virol. (INSTITUT PASTEUR), 1980,
131 E, 85-94.

REVENDICATIONS

1) Virus de la vaccine caractérisé en ce qu'il comporte tout ou partie d'une séquence ADN(I) codant pour une glycoprotéine antigénique de la rage.

5 2) Virus selon la revendication 1, caractérisé en ce que la séquence ADN codant pour une glycoprotéine antigénique de la rage est la séquence d'ADN codant pour la glycoprotéine mature complète.

10 3) Virus selon la revendication 1, caractérisé en ce que la séquence d'ADN(I) est sous le contrôle d'un promoteur de la vaccine.

4) Virus selon la revendication 3, caractérisé en ce que le promoteur de la vaccine est le promoteur du gène de la protéine 7,5K de la vaccine.

15 5) Virus selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la séquence d'ADN(I) est insérée dans un gène non essentiel de la vaccine.

6) Virus selon la revendication 5, caractérisé en ce que la séquence d'ADN(I) est clonée dans un gène de la vaccine qui peut être le gène TK de la vaccine.

20 7) Virus selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il est thermosensible.

8) Cellule de mammifère infectée par un virus selon l'une des revendications 1 à 7.

25 9) Procédé de préparation d'une glycoprotéine antigénique de la rage, caractérisé en ce qu'on cultive des cellules selon la revendication 8 et que l'on récupère la glycoprotéine formée.

10) Glycoprotéine antigénique de la rage obtenue par la mise en oeuvre du procédé selon la revendication 9.

30 11) A titre de vaccin pour le traitement et la prévention de la rage, un virus selon l'une des revendications 1 à 7.

12) Vaccin selon la revendication 11, caractérisé en ce que le virus est vivant.

13) Vaccin selon la revendication 11, caractérisé en ce que le virus est inactivé.

5 14) A titre de vaccin pour le traitement et la prévention de la rage, une composition contenant à titre de principe actif au moins une glycoprotéine selon la revendication 10.

10 15) Antisérum contenant des anticorps dressés contre la glycoprotéine selon la revendication 10 ou contre le virus selon l'une des revendications 1 à 7.

PstI

-19-

61
 CCG CAG GGG GGG GGG GGG GGA AAG GTT CCT CAG GCT CIG CTG TTT GTA CCC CTT CTG GTT TTT CCA TTG TGT TTT GGG GAA TTC
 Met Val Pro Glu Ala Leu Leu Phe Val Pro Leu Leu Val Phe Pro Leu Cys Phe Gly Lys Phe

91

121

HindIIIHgiIIIPvuII

CCT ATT TAC ACG ATA CTA GAC AAG CTT GGT CCC TGG TGG GGG ATT GAC ATA CAT CAC CTC AGC TGC CCA AAC AAT TTG GTA GTG GAG GAC
 Pro Ile Thr Thr Ile Leu Asp Lys Leu Gly Pro Thr Ser Pro Ile Asp Ile His Leu Ser Cys Pro Asn Asn Leu Val Val Gly Asp

181

211

241

GAA GGA TGC ACC AAG CTG TGA GGG TTC TCC TAC ATG GAA CTT AAA GTT GGA TAG ATC TTA GCC ATA AAA ATG AAC GGG TTC ACT TGC ACA
 Glu Gly Cys Thr Asn Leu Ser Gly Phe Ser Thr Met Gly Leu Lys Val Gly Thr Ile Leu Ala Ile Lys Met Asn Gly Phe Thr Cys Thr

271

301

331

GGC GTT GTG ACG GAG GCT GAA ACC TAC ACT AAC TTC GGT TAT GTC ACA ACC ACG TTC AAA AGA AAG CAT TTC CCG CCA ACA CCA GAA
 Gly Val Val Thr Gly Ala Gly Thr Thr Asn Phe Val Gly Thr Thr Thr Phe Lys Arg Lys His Phe Arg Pro Thr Pro Asp

AvaiIIIHpaII/BstEII

GGA TGT AGA GCG GCG TAC AAC TGG AAG ATG GCG GAT GAC GCC AGA TAT GAA GAG TCT CTA CAC AAT CCG TAC CCT GAC TAC CCG TGG CTT
 Arg Lys Arg Ala Ala Tyr Asn Thr Lys Met Ala Gly Asn Pro Arg Tyr Gly Gly Ser Asn Pro Thr Pro Asp Tur Asp Tur Asp

AsuII

481

511

CGA ACF GTA AAA ACC ACC AAG GAG ICT CTC GTT ATC ATA TCT CCA AGT GTA GCA GAT TTG GAC CCA TAT GAC AGA TCC CTT GAT TCG AGG
 Arg Thr Val Lys Thr Lys Gly Ser Leu Val Ile Ile Ser Pro Ser Val Ala Asp Leu Asp Pro Lys Asp Arg Ser Leu Thr Trp Leu

XhoI/AvaI

541

571

601

GTC TTC CCT ABC GGG AAG TGC TCA GGA GTA GCG GTG ICT TCT ACC TAC TGC TCC ACT AAC CAC GAT TAC ACC ATT TGG ATG CCG GAG AAT
 Val Phe Pro Ser Gly Lys Lys Ser Gly Val Ala Val Ser Ser Thr Tyr Cys Ser Thr Asn His Asp Thr Thr Thr Ile Trp Met Pro Gly Asn

AvaI

631

661

691

CCG AGA CTA GGG ATG TCT TGT GAC ATT TTT ACC AAT AGT AGA GGG AAG AGA GCA TCC AAA GGG AGT GAG ACT TGC GGC TTT GTA GAT GAA
 Pro Arg Leu Gly Met Ser Cys Asp Ile Phe Thr Asn Ser Arg Gly Lys Arg Ala Ser Lys Gly Ser Gly Thr Cys Gly Phe Val Asp Gly

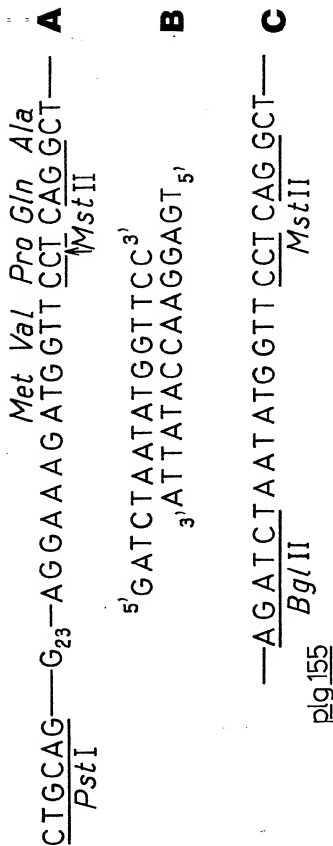
721

751

781

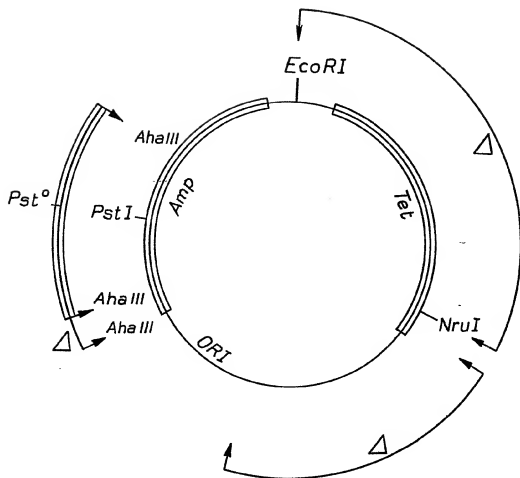
AGG GCG GAT AAG TCT TGG AGG GGA AGG TGA AAA CTC AAG TTA TGT GGA GAT CTA GCG CTT AGA CTT ATG GAT GAA ACA TGG GCG GCG
 Arg Gly Thr Lys Ser Leu Lys Gly Lys Leu Lys Leu Cys Gly Val Leu Gly Arg Leu Met Asp Gly Thr Trp Val Met Arg

SphIStuI/HaeINruIFIG. 1a

FIG. 2

5'-TACACGATCCCAGACAAGC-3'

FIG. 3

FIG. 4

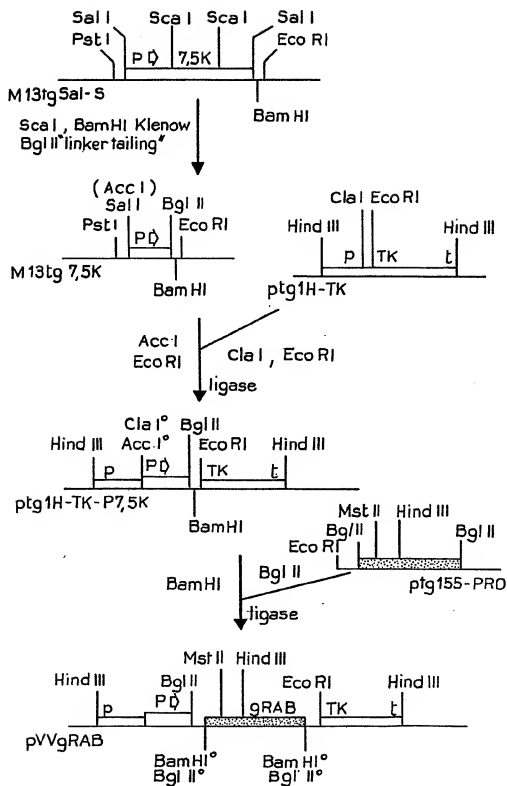
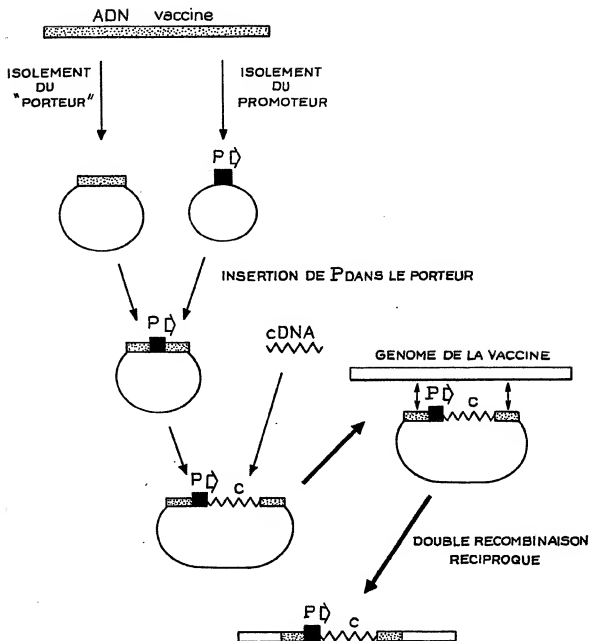
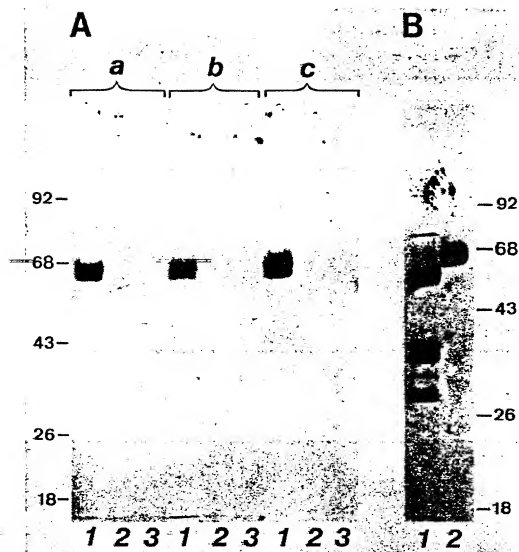


FIG.5

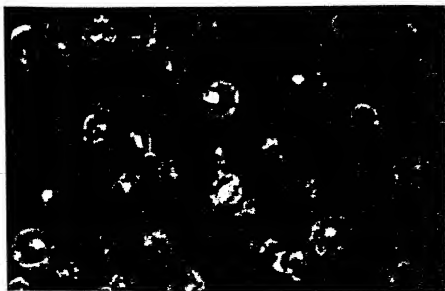
IN VITRO

IN VIVO

FIG-6

FIG. 7

0162757
8/8



A



B

FIG. 8



C



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

01 62757

Numéro de la demande

EP 85 40 0805

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.4)
X,P	NATURE, vol. 312, 8 novembre 1984, pages 163-166; M.P. KIENY et al.: "Expression of rabies virus glycoprotein from a recombinant vaccinia virus" * En entier *	1-15	A 61 K 39/295 A 61 K 39/285 A 61 K 39/205 C 12 N 15/00 A 61 K 39/42
X,P	--- PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES USA, vol. 81, novembre 1984, pages 7194-7198; T.J. WIKTOR et al.: "Protection from rabies by a vaccinia virus recombinant containing the rabies virus glycoprotein gene" * En entier *	1-15	
A	--- EP-A-0 083 286 (HEALTH RESEARCH INC.) -----		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.4) A 61 K C 12 N
Le présent rapport de recherche a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 24-07-1985	Examineur REMPP G.L.E.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	